

Three-site substituted beta-carboline novel compound having anti-HIV and anti-cancer activity**Publication number:** CN1358720 (A)**Also published as:****Publication date:** 2002-07-17 CN1160352 (C)**Inventor(s):** YANG MING [CN]; LIN WEI [CN]; YU XIAOLIN [CN]**Applicant(s):** UNIV BEIJING [CN]**Classification:**

- **international:** A23L1/30; A61K31/437; A61P31/18; A61P35/00; A61P39/06; C07D471/04; A23L1/30; A61K31/4353; A61P31/00; A61P35/00; A61P39/00; C07D471/00; (IPC1-7): C07D471/04; A23L1/30; A61K31/437; A61P31/18; A61P35/00; A61P39/06

- **European:**

Application number: CN20011044531 20011219**Priority number(s):** CN20011044531 20011219**Abstract of CN 1358720 (A)**

The present invention relates to a 3-substituted beta-carboline compound with activity for resisting HIV and resisting cancers. Said invention also provides its chemical structural formula, and provides the medicines made up said compound.

Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07D471/04

[12] 发明专利申请公开说明书

A61K 31/437 A61P 35/00

A61P 31/18 A61P 39/06

A23L 1/30

[21] 申请号 01144531.9

//(C07D471/04,22

1: 00,209: 00)

[43] 公开日 2002 年 7 月 17 日

[11] 公开号 CN 1358720A

[22] 申请日 2001.12.19 [21] 申请号 01144531.9

[71] 申请人 北京大学

地址 100083 北京市海淀区学院路 38 号

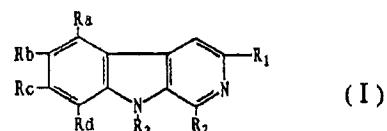
[72] 发明人 杨 铭 林 伟 于晓琳
肖苏龙 李敬云

权利要求书 4 页 说明书 10 页 附图页数 0 页

[54] 发明名称 具有抗 HIV 和抗癌活性的 3-位取代的 β -咔啉新化合物

[57] 摘要

式(I)化合物:其中:R₁代表 COR₄, CONHR₄, 其中 R₄代表氢原子、烷基、芳基、环烷基、杂环、单-(C₁-C₆)烷基氨基、单-(C₁-C₆)烷基胍基、二-(C₁-C₆)烷基胍基, R₂代表氢原子、烷基、COR₄, 其中 R₄是如说明书所定义的, R₃代表氢原子、烷基或芳基, R_a、R_b、R_c 和 R_d可以是相同或不同的, 代表如说明书所定义的基团, 它们及其与药学上可接受的酸或碱所形成的加成盐及药物。



ISSN 1008-4274

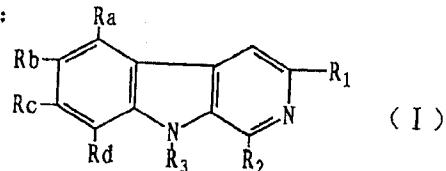
知识产权出版社出版

01.12.19

权 利 要 求 书

1. 式 (I) 化合物:

其中:



(I)

R₁ 所代表的基团选自:

COR₄, 其中 R₄ 代表氢原子, 直链或支链 (C₁-C₆) 烷基、芳基、环烷基、杂环、单- (C₁-C₆) 烷基氨基、单- (C₁-C₆) 烷基胍基、二- (C₁-C₆) 烷基胍基, 各基团的烷基部分可以是直链或支链的。

CONHR₄ 其中 R₄ 是如上定义的。

R₂ 所代表的基团选自:

氢,

直链或支链 (C₁-C₆) 烷基,

COR₄ 中 R₄ 是如上定义的,

R₃ 代表氢原子、直链或支链 (C₁-C₆) 烷基或芳基- (C₁-C₆) 烷基, 后者的烷基部分可以是直链或支链的。

R_a、R_b、R_c 和 R_d 可以相同或不同, 彼此独立地所代表的基团选自氢、卤素、直链或支链 (C₁-C₆) 烷基、羟基、直链或支链 (C₁-C₆) 烷氧基。——其中各烷基部分可以是直链或支链的; ——羟基、直链或支链的烷基羧基氧基、直链或支链 (C₁-C₆) 酰基、芳氧基和芳基— (C₁-C₆) 烷氧基; ——其中烷氧基部分可以是直链或支链的……。

所有化合物及其在药学上可接受的酸或碱所形成的加成盐,

毫无疑问:

— “芳基”被理解为苯基、萘基、四氢萘基、二氢萘基、茚基或 2, 3-二氢茚基, 各自任选地被一个或多个相同或不同的基团取代, 取代基选自卤素、羟基、氰基、硝基, 直链或支链 (C₁-C₆) 烷基、直链或支链 (C₁-C₆) 烷氧基、氨基、直链或支链 (C₁-C₆) 烷基氨基; ——其中各烷氧基部分可以是直链或支链的——, 直链或支链 (C₁-C₆) 酰基、直链或支链 (C₁-C₆) 烷氧基羧基, 直链或支链 (C₁-C₆) 烷基氨基羧基和羟代。

— “杂环”被理解为饱和或不饱和的单一或二-环基团, 具有芳族和非芳族特征, 具有 5 至 12 个环原子, 含有一个、两个或三个相同或不同的杂原子, 杂原子选自氧、氮和硫, 杂环被理解为可以任选地被一个或多个相同或不同的取代

01.12.19

基取代，取代基选自卤素、羟基、直链或支链(C₁-C₆)烷基、直链或支链(C₁-C₆)烷氧基、硝基、氧化和氨基(任意被一个或两个直链或支链(C₁-C₆)烷基取代。在杂环中，可以象征性而不加任何限制地提到吡啶基、噻吩基、呋喃基、咪唑基、4-H-吡喃-4-酮、吡嗪基、嘧啶基、异恶唑基、四唑基、吡咯基、吡唑基、喹啉基、异喹啉基、喹唑啉基、吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、1, 2, 3-噁二唑基……。

2、根据权力要求1的式(I)化合物，其特征在于R₁代表COR_{4a}基，其中R₄是如式(I)定义的。

它们及其与药学上可接受的酸或碱所形成的加成盐。

3、根据权力要求1或2的式(I)化合物，其特征在于R₁代表CONHR_{4a}，R_{4a}代表单链(C₁-C₆)烷基氨基、单链(C₁-C₆)烷基胍基。

它们及其与药学上可接受的酸或碱所形成的加成盐。

4、根据权力要求1的式(I)化合物，其特征在于R₂所代表的基团选自：氢、直链或支链(C₁-C₆)烷基、COR₄，其中R₄是如上定义的。

它们及其与药学上可接受的酸或碱所形成的加成盐。

5、根据权力要求1或4的式(I)化合物，其特征在于R₂代表氢或甲基。

它们及其与药学上可接受的酸或碱所形成的加成盐。

6、根据权力要求1的式(I)化合物，其特征在于R₃代表氢原子、直链或支链的(C₁-C₆)烷基或芳基(C₁-C₆)烷基，后者的烷基部分可以是直链或支链的。

它们及其与药学上可接受的酸或碱所形成的加成盐。

7、根据权力要求1或6的式(I)化合物，其特征在于R₃代表氢原子或甲基。

它们及其与药学上可接受的酸或碱所形成的加成盐。

8、根据权力要求1的式(I)化合物，它是3-丙氨基-β-呋喃-3-甲酰胺。

它及其与药学上可接受的酸或碱所形成的加成盐。

9、根据权力要求1的式(I)化合物，它是1-甲基-3-乙氨基-β-呋喃-3-甲酰胺。

它及其与药学上可接受的酸或碱所形成的加成盐。

10、根据权力要求1的式(I)化合物，它是1-甲基-3-丙氨基-β-呋喃-3-甲酰胺。

它及其与药学上可接受的酸或碱所形成的加成盐。

11、根据权力要求1的式(I)化合物，它是3-(2-胍基)-乙基-β-呋喃-3-甲酰胺。

它及其与药学上可接受的酸或碱所形成的加成盐。

01.12.19

12、根据权力要求 1 的式 (I) 化合物, 它是 3-(3-胍基)-丙基- β -咔啉-3-甲酰胺。

它及其与药学上可接受的酸或碱所形成的加成盐。

13、根据权力要求 1 的式 (I) 化合物, 它是 3-(6-胍基)-己基- β -咔啉-3-甲酰胺。

它及其与药学上可接受的酸或碱所形成的加成盐。

14、根据权力要求 1 的式 (I) 化合物, 它是 3-(12-胍基)-十二烷基- β -咔啉-3-甲酰胺。

它及其与药学上可接受的酸或碱所形成的加成盐。

15、根据权力要求 1 的式 (I) 化合物, 它是 1-甲基-3-(2-胍基)-乙基- β -咔啉-3-甲酰胺。

它及其与药学上可接受的酸或碱所形成的加成盐。

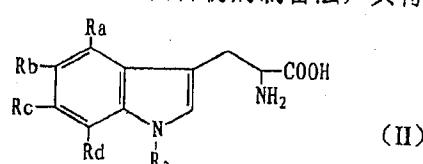
16、根据权力要求 1 的式 (I) 化合物, 它是 1-甲基-3-(3-胍基)-丙基- β -咔啉-3-甲酰胺。

它及其与药学上可接受的酸或碱所形成的加成盐。

17、根据权力要求 1 的式 (I) 化合物, 它是 1-甲基-3-(6-胍基)-己基- β -咔啉-3-甲酰胺。

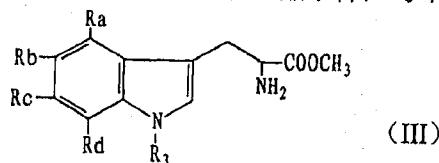
它及其与药学上可接受的酸或碱所形成的加成盐。

18、式 (I) 化合物的制备法, 其特征在于使用 (II) 化合物作为原料:



其中 Ra、Rb、Rc、Rd 和 R₃ 是如上定义的。

按照有机合成中常规成酯条件, 与甲醇得到式 (III) 化合物。



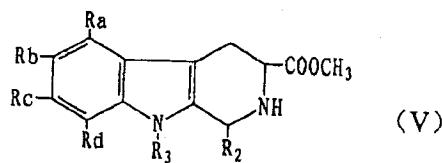
按照有机合成中的 Pictet-Spengler 反应条件, 使该式 (III) 化合物与 (IV) 化合物反应:



其中, R₂ 是如式 (I) 定义的。

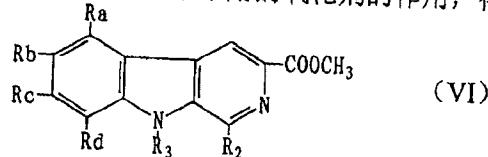
得到式 (V) 化合物:

01.12.19



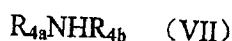
其中 Ra、Rb、Rc、Rd、R₂ 和 R₃ 是如上定义的。

受到有机合成中常用的氧化剂的作用，得到式 (VI) 化合物



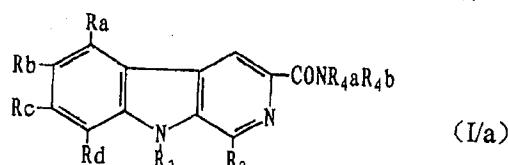
其中 Ra、Rb、Rc、Rd、R₂ 和 R₃ 是如上定义的。

按照常规的酰胺化条件，用式 (VII) 化合物处理：



其中 R_{4a} 和 R_{4b} 是如上定义的。

得到式 (I/a) 化合物，即式 (I) 化合物的一个特定例子：

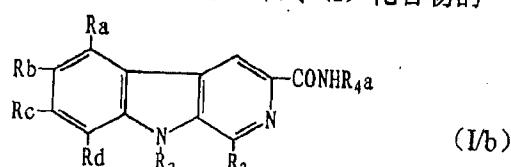


其中 Ra、Rb、Rc、Rd、R₂、R₃、R_{4a} 和 R_{4b} 是如上定义的。

将该式化合物置于式 (VIII) 化合物的作用下：



得到式 (I/b) 化合物，即式 (I) 化合物的一个特定例子：



其中 Ra、Rb、Rc、Rd、R₂、R₃ 和 R_{4b} 是如上定义的。

19、药物组合物，包含至少一种根据权利要求 1 至 17 任意一项的式 (I) 化合物作为活性成分，单独或结合一种或几种药学上可接受的、惰性的、无毒的赋形剂或载体。

20、根据权利要求 19 的药物组合物，包含至少一种根据权利要求 1 至 18 任意一项的活性成分，用于抗艾滋病、抗癌治疗。

21、根据权利要求 19 的药物组合物，包含至少一种根据权利要求 1 至 18 任意一项的活性成分，用于食品或药品中的抗氧化剂及疾病中的抗氧化治疗。

01.12.10

说 明 书

具有抗 HIV 和抗癌活性的 3-位取代的 β -咔啉新化合物

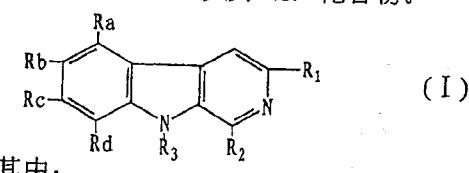
本发明涉及 3-位取代的 β -咔啉新化合物。该类新化合物对 HIV-1 基因组 TAR RNA 具有结合作用，能够抑制 HIV-1 Tat 蛋白与 TAR RNA 的结合，从而干扰病毒的复制，产生抗病毒活性。抑制 HIV-1 复制体外实验结果表明，在不显示毒性的剂量下，该类化合物显示了很好的抗病毒活性，这与体外转录的实验结果相吻合。同时该类化合物具有抗肿瘤作用及抗 OH⁻对 DNA 断裂的抗氧化作用。

HIV-1 TAR RNA 是存在于 HIV-1 病毒 mRNA 上的一段基因组，当 HIV-1 Tat 蛋白结合于 TAR RNA 时，激活了病毒的转录，使转录物延长，病毒得以复制。目前抗 HIV-1 药物主要针对病毒复制和转录两个阶段的关键酶：蛋白酶和逆转录酶。但这两种酶由于病毒本身的变异和遗传异质性而极易产生耐药性。因此，研究者再次回到 HIV-1 病毒的基础研究中，发现了 TAR RNA 和 Tat 蛋白的结合在病毒生命中的重要作用。由此 HIV-TAR RNA 成为近年来研究的热点。目前，国外正有一些研究机构从事 TAR RNA 为靶的抗艾滋病药物研究；国内除本组外尚无人对该靶进行药物设计的研究。因此，如以 TAR RNA 为研究靶，发现一种新的抗 HIV-1 的药物，那么就可以达到医治艾滋病患者的目的。

文献中已经描述了大量的 β -咔啉化合物。尤其对于其 HT_{2c} 受体强烈亲合性的报导。日本对 β -咔啉化合物进行过抗癌活性研究，德国专利 GP19502753，要求保护具有体外对抗细胞增殖作用的 β -咔啉化合物。欧洲专利申请 EP373986 要求保护 β -咔啉化合物 Fravopereirine，它具有强烈的抗癌活性和抗病毒（包括 HIV）活性。

除了本发明化合物是新颖的以外，它们还被证明是有效地抗 HIV-1、抗癌及抗 OH⁻ 对 DNA 断裂作用的物质。因此它们可用于艾滋病、癌症治疗及医疗食品、疾病治疗中的抗氧化剂。

本发明更确切地涉及 (I) 化合物。



其中：

R₁ 所代表的基团选自：

COR₄，其中 R₄ 代表氢原子，直链或支链 (C₁-C₆) 烷基、芳基、环烷基、杂环、单- (C₁-C₆) 烷基氨基、单- (C₁-C₆) 烷基胍基、二- (C₁-C₆) 烷基胍基，各基团的烷基部分可以是直链或支链的，

CONHR₄ 其中 R₄ 是如上定义的，

01-12-19

R_2 所代表的基团选自：

氢，

直链或支链 (C_1-C_6) 烷基，

COR_4 其中 R_4 是如上定义的，

R_3 代表氢原子、直链或支链 (C_1-C_6) 烷基或芳基- (C_1-C_6) 烷基，后者的烷基部分可以是直链或支链的，

R_a 、 R_b 、 R_c 和 R_d 可以相同或不同，彼此独立地所代表的基团选自氢、卤素、直链或支链 (C_1-C_6) 烷基、羟基、直链或支链 (C_1-C_6) 烷氧基。——其中各烷基部分可以是直链或支链的；——羟基、直链或支链的烷基羰基氧基、直链或支链 (C_1-C_6) 酰基、芳氧基和芳基—— (C_1-C_6) 烷氧基；——其中烷氧基部分可以是直链或支链的……。

所有化合物及其在药学上可接受的酸或碱所形成的加成盐，

毫无疑问：

-- “芳基”被理解为苯基、萘基、四氢萘基、二氢萘基、茚基或 2, 3-二氢茚基，各自任选地被一个或多个相同或不同的基团取代，取代基选自卤素、羟基、氰基、硝基，直链或支链 (C_1-C_6) 烷基、直链或支链 (C_1-C_6) 烷氧基、氨基、直链或支链 (C_1-C_6) 烷基氨基；--其中各烷氧基部分可以是直链或支链的--，直链或支链 (C_1-C_6) 酰基、直链或支链 (C_1-C_6) 烷氧基羰基，直链或支链 (C_1-C_6) 烷基氨基羰基和氧代。

-- “杂环”被理解为饱和或不饱和的单-或二-环基团，具有芳族和非芳族特征，具有 5 至 12 个环原子，含有一个、两个或三个相同或不同的杂原子，杂原子选自氧、氮和硫，杂环被理解为可以任选地被一个或多个相同或不同的取代基取代，取代基选自卤素、羟基、直链或支链 (C_1-C_6) 烷基、直链或支链 (C_1-C_6) 烷氧基、硝基、氧代和氨基（任意被一个或两个直链或支链 (C_1-C_6) 烷基取代）。

在杂环中，可以象征性而不加任何限制地提到吡啶基、噻吩基、呋喃基、咪唑基、4-H-吡喃-4-酮、吡嗪基、嘧啶基、异恶唑基、四唑基、吡咯基、吡唑基、喹啉基、异喹啉基、喹唑啉基、吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、1, 2, 3-噻二唑基……。

在药学上可接受的酸中，可以不加任何限制地提到盐酸、氯溴酸、硫酸、磷酸、乙酸、三氟乙酸、乳酸、丙酮酸、丙二酸、琥珀酸、戊二酸、富马酸、酒石酸、马来酸、柠檬酸、抗坏血酸、草酸、甲磺酸、樟脑酸等。

在药学上可接受的碱中，可以不加任何限制地提到氢氧化钠、氢氧化钾、三乙胺、叔丁胺等。

按照一种有利的变例，优选的本发明化合物是，其中， R_1 是 COR_4 其中 R_4 是如式 (I) 定义的。按照一种有利的变例，优选的取代基 R_1 是 $CONR_{4a}R_{4b}$ 其中

01.12.19

当 R_{4b} 代表氢原子时, R_{4a} 代表单链 (C_1-C_6) 烷基氨基、单链 (C_1-C_6) 烷基胍基; R_{4a} 和 R_{4b} 相连时, 代表哌嗪。

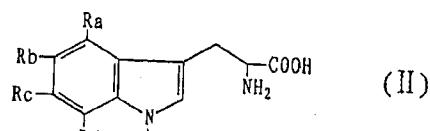
按照本发明, 优选的取代基 R_2 和 R_3 是氢原子和单一直链 (C_1-C_6) 烷基。尤其有利的是 R_2 和 R_3 代表氢原子和甲基。

按照本发明, 优选的化合物是:

3-乙氨基- β -咔啉-3-甲酰胺
3-丙氨基- β -咔啉-3-甲酰胺
3-己氨基- β -咔啉-3-甲酰胺
9-甲基-3-丙氨基- β -咔啉-3-甲酰胺
1-甲基-3-乙氨基- β -咔啉-3-甲酰胺
1-甲基-3-丙氨基- β -咔啉-3-甲酰胺
1-甲基-3-哌嗪基- β -咔啉-3-甲酰胺
1-甲基-3-己氨基- β -咔啉-3-甲酰胺
1, 9-二甲基-3-丙氨基- β -咔啉-3-甲酰胺
3-(2-胍基)-乙基- β -咔啉-3-甲酰胺
3-(3-胍基)-丙基- β -咔啉-3-甲酰胺
3-(6-胍基)-己基- β -咔啉-3-甲酰胺
3-(12-胍基)-十二烷基- β -咔啉-3-甲酰胺
1-甲基-3-(2-胍基)-乙基- β -咔啉-3-甲酰胺
1-甲基-3-(3-胍基)-丙基- β -咔啉-3-甲酰胺
1-甲基-3-(6-胍基)-己基- β -咔啉-3-甲酰胺

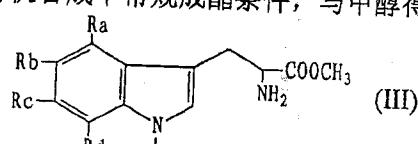
优选化合物以及它们与药学上可接受的酸或碱所形成的加成盐构成本发明的完整内容的一部分。

本发明还涉及式 (I) 化合物的制备方法, 其特征在于使用 (II) 化合物作为原料:



其中 R_a 、 R_b 、 R_c 、 R_d 和 R_3 是如上定义的。

按照有机合成中常规成酯条件, 与甲醇得到式 (III) 化合物。



其中 R_a 、 R_b 、 R_c 、 R_d 和 R_3 是如上定义的。

按照有机合成中的 Pictet-Spengler 反应条件, 使该式 (III) 化合物与 (IV)

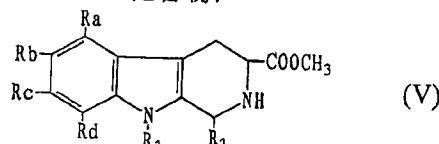
01.12.19

化合物反应:



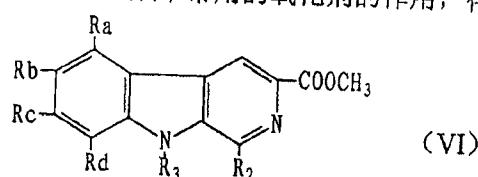
其中, R_2 是如式 (I) 定义的。

得到式 (V) 化合物:



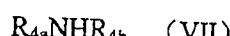
其中 R_a 、 R_b 、 R_c 、 R_d 、 R_2 和 R_3 是如上定义的。

受到有机合成中常用的氧化剂的作用, 得到式 (VI) 化合物



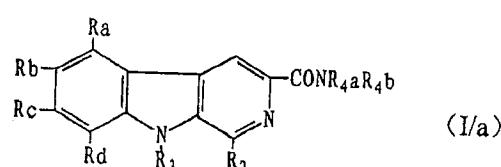
其中 R_a 、 R_b 、 R_c 、 R_d 、 R_2 和 R_3 是如上定义的。

按照常规的酰胺化条件, 用式 (VII) 化合物处理:



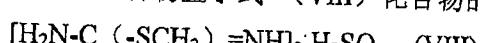
其中 R_{4a} 和 R_{4b} 是如上定义的。

得到式 (I/a) 化合物, 即式 (I) 化合物的一个特定例子:

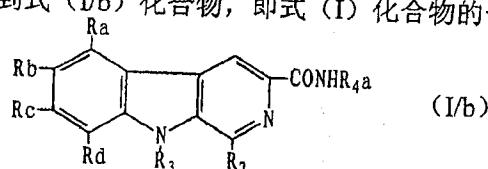


其中 R_a 、 R_b 、 R_c 、 R_d 、 R_2 、 R_3 、 R_{4a} 和 R_{4b} 是如上定义的。

将该式化合物置于式 (VIII) 化合物的作用下:



得到式 (I/b) 化合物, 即式 (I) 化合物的一个特定例子:



其中 R_a 、 R_b 、 R_c 、 R_d 、 R_2 、 R_3 和 R_{4a} 是如上定义的。

化合物 (I/a) 和 (I/b) 构成本化合物的整体。如果必要的话, 这些化合物按照常规的纯化工艺进行纯化, 如果需要的话, 可以任选地用医学上可接受的酸或碱转化为加成盐。

式 (II)、(IV)、(VII)、(VIII) 化合物是商业上可得到的化合物, 或者是

01.12.19

按照有机合成的已知方法得到的化合物。

本发明还涉及药物组合物，包含至少一种式(I)化合物或与药学上可接受的酸或碱所形成的加成盐作为活性成分，单独或结合一种或几种药学上可接受的、惰性的、无毒的赋形剂或载体。

在按照本发明的药物组合中，可以特别提到适用于口服、胃肠外（静脉内、肌肉或皮下），经皮或透皮、经鼻、直肠、经舌、经眼或呼吸给药的那些，尤其是片剂或糖衣丸、舌下片、扁囊剂、胶囊剂、锭剂、栓剂、霜剂、软膏剂、皮肤凝胶、可注射成可饮用制剂、气雾剂、滴眼剂或滴鼻剂等。

本发明化合物具有抗 HIV-1 活性、抗癌活性及抗 OH⁻ 断裂 DNA 的抗氧化活性。含有一至少一种式(I)化合物的药物组合因此可以用于 HIV-1 的治疗，癌症治疗及疾病、食品、医药品中的抗氧化剂。

作为药物，有用剂量因患者年龄与体重、给药途径、疾病性质与严重性和所接受的任何其它治疗而异。

下列实施例阐述而绝非限制本发明：

所用原料和/或试剂是已知的产品，或者是按照已知操作制备的产品。

实施例和合成步骤中所述化合物的结构是按照常规的光谱技术（红外，NMR、TOF-质谱……）测定的。

实施例 1 3-乙氨基-β-咔啉-3-甲酰胺

步骤 A：盐酸色氨酸甲酯

1.0ml 氯化亚砜在-4°C 下滴入 1.0g L-色氨酸与 20ml 无水甲醇的混悬液中，加毕，撤去冰水浴，室温搅拌 6 小时后，70°C-80°C 回流 6 小时，减压蒸去溶剂，得到预期产物。

步骤 B：1, 2, 3, 4-四氢-β-咔啉-3-甲酸甲酯

将 1.25g 步骤 A 中得到的产物溶于 75ml 甲醇中，加入 37% 甲醛 0.95ml，蒸气浴回流 2 小时后，减压蒸去溶剂，用 14% 浓氨水调 pH 8 至 9，加入 40ml 氯仿萃取，再用 3×20ml 氯仿洗水层，合并氯仿层，无水硫酸钠干燥过夜，滤除硫酸钠，滤液减压蒸干，得到预期产物。

步骤 C：β-咔啉-3-甲酸甲酯

将 0.5g 步骤 B 中得到的产物溶于 10ml 冰醋酸中，冷水浴中，快速搅拌下加入四醋酸铅 2.25g，加毕，搅拌 20 分钟，加入 2.5g 草酸，搅拌 1 小时，过滤，沉淀混悬于 25ml 水和 50ml 氯仿的混合溶液中，用碳酸氢钠调 pH 至中性，过滤分两层，收集氯仿层，用饱和食盐水洗氯仿层，分出氯仿层，无水硫酸钠干燥过夜，过滤除去硫酸钠，滤液减压蒸干，得到预期产物。

步骤 D：3-乙氨基-β-咔啉-3-甲酰胺

01.12.19

将 0.1g 步骤 C 中得到的产物溶于 4ml 氯仿和 5 滴甲醇中，将该溶液于 3 小时内滴入加热至 80℃-85℃ 的 1ml 1,2-乙二胺中，加毕，加热回流 6 小时后，减压浓缩，残渣中加入 5ml 氯仿和 3ml 水的混合液，充分搅拌后静置过夜。次日析出固体，过滤，用少量水和甲醇分别洗固体，收集固体于真空干燥，得到预期产物。

熔点：234-237℃

EI-MS: 255

¹H-NMR: 12.26, 9.08, 8.92, 8.87, 8.45, 7.69, 7.61, 3.63, 3.03

实施例 2：3-丙氨基-β-咔啉-3-甲酰胺

操作同实施例 1，在步骤 D 中使用 1,3-丙二胺作为反应物。

熔点：218-222℃

EI-MS: 269

¹H-NMR: 8.917, 8.889, 8.835, 8.395, 7.673, 7.591, 7.297, 3.420,

2.614, 1.638

实施例 3：3-己氨基-β-咔啉-3-甲酰胺

操作同实施例 1，在步骤 D 中使用 1, 6-己二胺作为反应物

熔点：189-193℃

EI-MS: 311

¹H-NMR: 8.93, 8.84, 8.37, 7.67, 7.58, 7.25, 3.42, 3.28, 2.78, 1.82

实施例 4：9-甲基-3-丙氨基-β-咔啉-3-甲酰胺

操作同实施例 2，在步骤 A 中用 1-甲基-L-色氨酸作为反应物。

熔点：116-118℃

EI-MS: 282

实施例 5：1-甲基-3-乙氨基-β-咔啉-3-甲酰胺

步骤 E：1-甲基-1, 2, 3, 4-四氢-β-咔啉-3-甲酸甲酯

取 0.5g L-色氨酸，加入 1N 硫酸 2.5ml 和 8ml 水的混合液，搅拌下加入 40% 乙醛 3.6ml，40℃ 水浴加热 30 分钟，室温搅拌 2 小时，于蒸汽浴上加热回流 1.5 小时，冷至室温，用浓氨水调 pH 至 8，过滤，用冷水洗涤沉淀，收集沉淀，室温晾干，将得到的沉淀按步骤 B 进行酯化，得到预期产物。

步骤 F：1-甲基-β-咔啉-3-甲酸甲酯

取 1.5g 步骤 E 得到的产物，加入 4.2g 硫，100ml 干二甲苯，回流 4.5 小时，将反应液冷至 5℃ 过夜，次日过滤，用 40ml 冷二甲苯和低沸点的石油醚依次洗涤沉淀，收集沉淀，真空干燥，得到预期目标化合物。

将步骤 F 得到的化合物按步骤 D 反应，得到预期的化合物。

01.12.19

熔点: 黄油状

EI-MS: 268

¹H-NMR: 11.15, 8.72, 8.34, 7.64, 7.58, 6.8, 3.1-3.67, 2.83

实施例 6: 1-甲基-3-丙氨基-β-咔啉-3-甲酰胺

操作同实施例 5, 在步骤 D 中用 1,3-丙二胺作为反应物。

熔点: 175-177°C

EI-MS: 292

¹H-NMR: 12.03, 8.77, 8.35, 7.67, 7.59, 7.30, 3.56, 3.33, 2.83, 1.9

实施例 7: 1-甲基-3-己氨基-β-咔啉-3-甲酰胺

操作同实施例 5, 在步骤 D 中用 1,6-己二胺作为反应物

熔点: 243°C (碳化)

EI-MS: 324

实施例 8: 1-甲基-3-哌嗪基-β-咔啉-3-甲酰胺

操作同实施例 5, 在步骤 D 中用哌嗪作为反应物。

熔点: 192-194°C

EI-MS: 294

实施例 9: 1,9-二甲基-3-丙氨基-β-咔啉-3-甲酰胺

操作同实施例 5, 在步骤 E 中用 1-甲基-L-色氨酸作为反应物, 在步骤 D 中用 1,3 丙二胺作为反应物。

熔点: 149-151°C

EI-MS: 296

实施例 10: 3-(2-胍基)-乙基-β-咔啉-3-甲酰胺

步骤 G: 称取 S-甲基异硫脲硫酸盐 0.021g, 加 0.03ml 水和 0.03ml 2M 氢氧化钠, 快速搅拌下滴加实施例 1 中得到的化合物 0.1g 混悬于 2ml H₂O 的混合液, 加毕, 室温搅拌两天, 4°C 放置过夜, 过滤, 沉淀分别用少量的水和甲醇洗涤, 收集沉淀, 真空干燥, 得到预期化合物。

熔点: 312-313°C

TOF-MS: 297.0486

实施例 11 3-(3-胍基)-丙基-β-咔啉-3-甲酰胺

操作同实施例 10, 在步骤 G 中使用实施例 2 得到的化合物作为反应物。

熔点: 199-201°C

TOF-MS: 311.0407

¹H-NMR: 8.92, 8.81, 8.37, 7.64, 7.58, 7.27, 3.41, 3.11, 1.75

¹³C-NMR: 165.08, 157.12, 141.10, 139.61, 137.23, 132.47, 128.38,

01.12.19

128.00,122.07,120.96,119.75,113.73,112.30,38.39,36.23,28.84

实施例 13 3-(12-胍基)-十二烷基-β-咔啉-3-甲酰胺

操作同实施例 10，在步骤 D 中用，1,12-二氨基-十二烷作为反应物，此产物在步骤 G 中作为反应物。

熔点：199-201℃

TOF-MS: 437.1623

实施例 14: 1-甲基-3-(2-胍基)-乙基-β-咔啉-3-甲酰胺

操作同实施例 10 在步骤 G 中使用实施例 5 得到的化合物作为反应物。

熔点：242-245℃

TOF-MS: 297.0486

实施例 15 1-甲基-3-(3-胍基)-丙基-β-咔啉-3-甲酰胺

操作同实施例 10，在步骤 G 中使用实施例 6 得到的化合物作为反应物。

熔点：270-272℃

TOF-MS: 325.0608

¹H-NMR: 12.03, 8.66, 8.28, 7.64, 7.53, 7.23, 3.36, 3.12, 2.82, 1.69

¹³C-NMR: 165.12, 157.13, 140.94, 140.84, 138.99, 135.85, 128.13,

127.31, 122.03, 121.42, 119.77, 112.27, 111.99, 36.30, 29.06, 20.41(2C)

实施例 16 1-甲基-3-(6-胍基)己基-β-咔啉-3-甲酰胺。

操作同实施例 10，在步骤 G 中使用实施例 7 得到的化合物作为反应物。

熔点：196-198℃

TOF-MS: 367.0860

本发明化合物的药理研究。

实施例 17 抗癌筛选试验，分别用 KB、HeLa、HL-60、BGC 及 BEL-7402 肿瘤细胞进行试验，用 MTT 法或 SRB 法。

MTT 法：分别将生长状态良好的、处于对数生长期的 HL-60、Bel-7402、KB 及 HeLa 细胞以 1×10^4 个/mL 浓度接种于 96 孔板，37℃5% CO₂ 培养箱中培养 24 小时。弃旧液，换新培养液，加入灭菌处理的化合物，继续培养 48 小时后，弃去培养液，每孔加 20mL 含 5mg/mL MTT 的 RPMI 1640 (含 10% 小牛血清) 培养液，继续培养 4 小时。离心，2500rpm, 20min, 吸出上清，室温晾干。加入一定量的二甲基亚砜溶解紫色残留物，于 570nm 处酶标仪上测定吸收值。

SRB 法：同 MTT 法一样。

分别将生长状态良好的、处于对数生长期的 HL-60、Bel-7402、KB 及 HeLa 细胞以 1×10^4 个/mL 浓度接种于 96 孔板，37℃5% CO₂ 培养箱中培养 24 小时。弃旧液，换新培养液，加入灭菌处理的化合物，继续培养 48 小时后，取上清，

01.12.19

每个小孔中加入 $100 \mu\text{l}$ 10% TCA(三氯醋酸)，静置 5 分钟后，于 4°C 放置 1 小时固定。然后倒掉固定液，每个小孔用水洗 5 遍。室温干燥后，每孔加入 0.4% SRB $100 \mu\text{l}$ ，室温放置 10 分钟后，用 1% HOAc(醋酸)洗 5 遍，空气干燥，加入 10mM Tris $200 \mu\text{l}$ /每孔，振荡溶解，于 540nm 单波长处测定 OD 值

实施例 18：急性试验

将药物制备成盐酸盐，用生理盐水溶解备用。首先进行预试验，找出 0% 及 100% 估计致死量；然后根据该结果，设定五个剂量组，剂量间距为 1: 0.8。昆明种小鼠（体重 $20 \pm 2\text{g}$ ）随机分为五组，每组 10 只，雌雄各半，给药后连续观察 14 天内动物毒性反应情况和死亡情况。累计 14 天内死亡动物数，输入计算机，用 Bliss 法统计程序计算其 LD_{50} 值和 95% 平均可信限。根据上述方法测得化合物 3-丙氨基-β-咔啉-3-甲酰胺对小鼠经腹腔给药的半数致死量(LD_{50})为 170mg/Kg 。

实施例 19：转录水平拮抗 HIV-1 Tat/TAR RNA 的结合

我们成功构建了两个质粒。一个是 Tat 基因表达质粒(plasmid I)，另一个是以 HIV-1 LTR 片段为启动子，含有氯霉素乙酰转移酶 (CAT) 报告基因的质粒 (plasmid II)。转化大肠杆菌后，经酶切鉴定得到阳性克隆。利用磷酸钙介导这两种质粒共转染 293 细胞，24 小时后加入 3 种样品，浓度均为 $30\mu\text{mol/L}$ 。收集 48 小时培养上清液，用 CAT ELISA 试剂盒在 405/490nm 波长下检测细胞上清液中 CAT 活力。考察样品对 Tat-TAR 相互作用的影响。

以未加样品的 plasmid I、II 共转染体系的 CAT 活力为 100%，用相对活性表示加样共转染体系的 CAT 活力。

实施例 20：抑制 HIV-1 复制体外试验。

采用 MT₄ 细胞与 HIV IIIB 株进行试验，使用的病毒量分为 100TCID_{50} 和 1000TCID_{50} (tissue cultured infection dose)。MT₄ 细胞和 HIV IIIB 株与不同剂量下的药物培养 5 天后，在显微镜下观察 CPE(细胞病变——空泡、肿胀、融合等)。设立五组实验：

对照： 药物+MT₄ 细胞

空白对照： MT₄ 细胞+ HIV IIIB

阴性对照： 水+ MT₄ 细胞+ HIV IIIB

阳性对照： AZT+ MT₄ 细胞+ HIV IIIB

实验组： 药物+MT₄ 细胞+ HIV IIIB

实施例 21：抗 OH⁻ 对 DNA 断裂的抗氧化活性，采用质粒 pBR322 进行试验，用 Fenton 反应诱导 OH⁻ 的产生。

本试验被广泛用于评价药物对抗 OH⁻ 对 DNA 断裂的保护能力。

步骤 A：

01.12.19

将化合物(5/0.5mM)2 μ l与四乙酸二钠(3mm), 磷酸二氢钾缓冲液(50mm, pH7.4), 双氧水(3mm), 硫酸亚铁(1.6mm)和pBR322质粒DNA各2ul, 混合于1.5ml Eppendorf管中, 保证硫酸亚铁/四乙酸二钠的比值为0.53, 总体积为12ul(不足的用水补充), 37℃孵育30分钟后, 每管加入2ul溴汾蓝, 琼脂糖凝胶电泳(0.8%琼脂粉, 1XTAE, pH7.4, 600mv, 约1小时)紫外透射仪下观察结果。

空白对照: 质粒DNA

阴性对照: 不加任何抗氧化活性物质

阳性对照: V_E(5mM)